

## Análise simultânea da mirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina em plasma empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

Ana Cecília Coragem Briguenti, Pierina Sueli Bonato\*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

*Para avaliação das propriedades farmacocinéticas e monitorização terapêutica da mirtazapina, antidepressivo recentemente introduzido no mercado e que vem sendo bastante utilizado, são necessários métodos de análise simples, sensíveis e seletivos. Sendo assim, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência foi empregada para o desenvolvimento de um método para análise simultânea da mirtazapina e de seu metabólito, *N*-desmetilmirtazapina, em plasma. Após extração líquido-líquido utilizando tolueno como solvente extrator, o fármaco, metabólito e padrão interno (metoprolol) foram separados em coluna LiChrospher 100 RP-8 capeada, utilizando fase móvel composta por tampão fosfato de sódio, 0,1 mol/L, pH 3,5-acetonitrila (82:18, v/v). O método apresentou linearidade no intervalo de 2,5 a 500 ng/mL para ambos os compostos, com recuperações médias de 77 e 66% para a mirtazapina e demetilmirtazapina, respectivamente. Os limites de quantificação (2,5 ng/mL), precisão (CV < 15%) e exatidão (erros relativos < 15%) do método asseguram a sua aplicabilidade em estudos de disposição cinética e para o controle terapêutico da mirtazapina.*

### Unitermos

- Mirtazapina
- *N*-desmetilmirtazapina
- HPLC
- Plasma

### \*Correspondência:

P. S. Bonato  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
de Ribeirão Preto, Av. Café, SN  
14040-903 - Ribeirão Preto - SP  
Email: psbonato@fcrp.usp.br

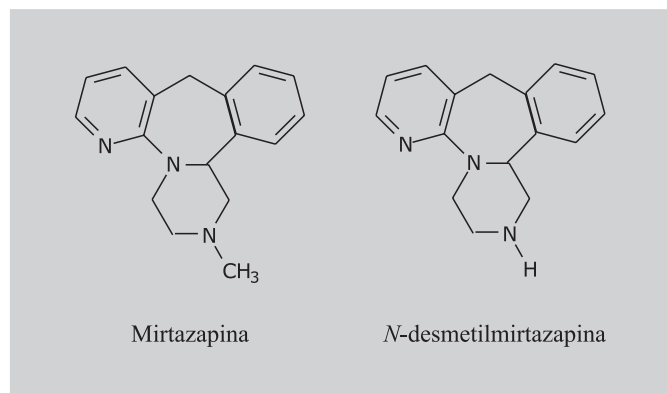
## INTRODUÇÃO

A mirtazapina (MTZ) é um novo antidepressivo, membro da classe das piperazinoazepinas, que possui modo de ação diferente de qualquer outro antidepressivo utilizado atualmente. A MTZ tem dupla ação, aumentando a atividade central noradrenérgica e serotoninérgica, através do bloqueio de receptores  $\alpha_2$  e do antagonismo seletivo de receptores 5HT<sub>2</sub> e 5HT<sub>3</sub>. (Fawcett, Barkin, 1998; Nutt, 1997; Sussman, Stahal, 1996). Devido à sua meia-vida de eliminação, de 20 a 40 horas, a MTZ é admi-

nistrada em uma dose única diária que varia de 15 a 45 mg, resultando em concentrações plasmáticas de 5 a 100 ng/mL (Timmer, Ad Sitsen, Delbressine, 2000; Fawcett, Barkin, 1998).

O metabolismo da MTZ já foi estudado em várias espécies de animais, bem como em humanos (Sandker *et al.*, 1994). As principais vias do metabolismo da MTZ são a *N*-desmetilação, a *N*-oxidação e 8-hidroxilação, seguidas de conjugação. A MTZ também sofre conjugação direta com uma glicoronida, formando um derivado amônio quaternário (N<sup>+</sup>) (Caccia, 1998; Timmer, Ad Sitsen,

Delbressine, 2000). As estruturas da MTZ e do metabólito encontrado no plasma, *N*-desmetilmirtazapina (DMTZ) são mostradas na Figura 1.



**FIGURA 1-** Estrutura da mirtazapina e *N*-desmetilmirtazapina.

O metabólito ativo da MTZ é a *N*-desmetilmirtazapina (DMTZ), que apresenta atividade farmacológica de 5 a 10 vezes menor (Timmer, Ad Sitsen, Delbressine, 2000) e se acumula nos tratamentos crônicos, atingindo concentrações plasmáticas próximas à da MTZ (Shams, Hiemke, Härtter, 2004).

A análise da MTZ em plasma tem sido feita empregando, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ptáek, Klíma e Macek (2003) validaram um método para análise da MTZ em plasma com um baixo limite de quantificação (1,5 ng/mL), entretanto, o método não foi validado para análise simultânea do metabólito. Outro método descrito na literatura emprega um detector por absorção no UV, HPLC em fase reversa e extração em fase sólida para a análise da MTZ e de outros antidepressivos e antipsicóticos, com limite de quantificação de 5 ng/mL (Frahner, Rao, Crasmäder, 2003).

A análise simultânea da MTZ e DMTZ foi relatada por Romiguires *et al.* (2002), empregando HPLC com fase reversa e um detector por absorção no UV, mas com limite de detecção de 20 ng/mL de plasma. Maris; Dingler; Niehues (1999) descreveram um método bastante sensível (limite de quantificação de 0,5 ng/mL), empregando detector por fluorescência, para análise simultânea da MTZ e DMTZ. Entretanto, a necessidade de utilização de eluição por gradiente e extração líquido-líquido em duas etapas, tornam esse método demorado e complicado para aplicações em análises de rotina.

O método descrito por Shams, Hiemke e Härtter (2004) para a análise simultânea da MTZ e DMTZ permitiu a análise direta das amostras de plasma, através de um sistema de comutação de colunas e apresentou limite de quantificação de 10 ng/mL para a MTZ e 5 ng/mL para o

metabólito. Morgan, Tapper e Spencer (2003) publicaram um método para a análise da MTZ e DMTZ no qual é empregada a extração líquido-líquido com pequenas quantidades de plasma (200 µL). O método é bastante sensível, apresentando limite de quantificação de 1 ng/mL para ambos os analitos e faixa ampla de linearidade (4 – 1000 ng/mL). No entanto, requer o uso de uma coluna de sílica modificada com grupos sulfopropil, pouco comum na maioria dos laboratórios que atua na análise de fármacos.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um novo método para análise e quantificação da mirtazapina e seu principal metabólito, a DMTZ, em plasma, visando à sua aplicação futura em estudos de disposição cinética e monitorização terapêutica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Soluções-padrão, solventes e reagentes

As soluções-padrão de MTZ e DMTZ, gentilmente cedidas pela N. V. Organon (Oss, Holanda), foram preparadas em metanol (grau cromatografia, Merck, Darmstadt, Alemanha), na concentração de 1 mg/mL. A partir destas soluções foram preparadas diluições nas concentrações de 0,1 a 20 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C, na ausência da luz. As soluções dos fármacos avaliados como padrão interno (metoprolol, Astrazeneca, Cotia, SP, Brasil, 50 µg/mL) e interferentes do método (Tabela III, 1,0 mg/mL) também foram preparadas em metanol.

A solução tampão fosfato de sódio usada na preparação da fase móvel foi preparada com água purificada no sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA), ácido fosfórico e hidróxido de sódio (grau p.a., Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A acetonitrila grau cromatografia utilizada foi obtida da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA) e J. T. Baker (Xalostoc, México). No procedimento de extração da amostra foi utilizado cloreto de sódio (grau p.a.) e tolueno (grau cromatografia) obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

### Equipamento

Foi empregado um cromatógrafo SHIMADZU (Kyoto, Japão), constituído por uma bomba modelo LC10AS, um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 50 µL e um integrador modelo C-R6A. Para detecção do fármaco e metabólito empregou-se um detector por fluorescência FD-500 (Groton Technologies Inc., Concord, MA, EUA) com comprimento de onda de excitação e emissão em 290 nm e 350 nm, respectivamente, e frequência de 60 Hz.

A análise cromatográfica foi conduzida em uma coluna LiChrospher 100 RP-8 capeada (4,6 x 150  $\mu$ m, 5 mm), protegida por uma coluna de guarda do tipo CN LiChrospher 100 (4 x 4 mm, 5  $\mu$ m), provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel empregada consistia de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 3,5-acetonitrila (82:18, v/v).

### Preparação das amostras

Aliquotas de 1 mL de plasma foram adicionadas de 25  $\mu$ L da solução do padrão interno, 500 mg de NaCl e alcalinizadas com 25  $\mu$ L de NaOH 0,5 mol/L. As amostras foram agitadas em “mixer” durante 20 segundos e, após repouso por 15 minutos, foram extraídas com 4 mL de tolueno (agitação horizontal por 30 minutos). Após centrifugação a 1800 x g durante 5 minutos, as fases orgânicas foram separadas e evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 80  $\mu$ L de fase móvel e 50  $\mu$ L foram cromatografados.

### Validação do método de análise

Para avaliação da linearidade, 25  $\mu$ L das soluções-padrão de MTZ e DMTZ foram adicionadas a 1 mL de plasma de modo a obter concentrações de 2,5, 5, 20, 50, 100, 250 e 500 ng/mL de plasma ( $n = 2$  para cada concentração). Em seguida, as amostras de plasma foram adicionadas de 25  $\mu$ L de solução do padrão interno na concentração de 50  $\mu$ g/mL e submetidas ao procedimento de extração e análise. A linha de regressão foi obtida plotando as concentrações no eixo das abcissas e a razão das alturas dos picos (pico do fármaco/pico do PI) no eixo das ordenadas.

Para avaliar a recuperação absoluta, amostras de plasma fortificadas com MTZ e DMTZ nas concentrações de 5, 20, 50 e 250 ng/mL ( $n = 3$  para cada concentração) foram submetidas ao processo de extração. As fases orgânicas obtidas foram adicionadas do padrão interno, evaporadas a secura e, após os resíduos terem sido dissolvidos na fase móvel, efetuou-se a análise cromatográfica. As concentrações dessas amostras foram calculadas empregando uma curva analítica, obtida pela análise direta do fármaco, metabólito e padrão interno na fase móvel.

A exatidão e precisão foram verificadas através de estudos interensaios e intra-ensaio. Foram preparadas amostras de plasma contendo concentrações conhecidas de MTZ e DMTZ (7,5, 100 e 400 ng/mL). Na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio, replicatas ( $n=5$ ) das amostras de plasma fortificadas foram analisadas em um mesmo dia. Para a precisão e exatidão interensaios, foram

considerados os resultados das análises realizadas em quatro dias consecutivos, em triplicata, para cada concentração. As concentrações de MTZ e DMTZ nessas amostras foram determinadas empregando curvas analíticas preparadas diariamente.

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras de plasma ( $n=5$ ) contendo concentrações decrescentes da mirtazapina e seu metabólito até o menor nível quantificável, com coeficientes de variação e erro relativo menores que 20%.

A seletividade do método foi avaliada através da análise de 25  $\mu$ L de soluções-padrão de diversos fármacos na concentração de 1 mg/mL, após secagem sob fluxo de ar e dissolução em 80  $\mu$ L de fase móvel. Análises de amostras de plasma branco também foram feitas para verificar a interferência de compostos endógenos.

### Aplicação do método

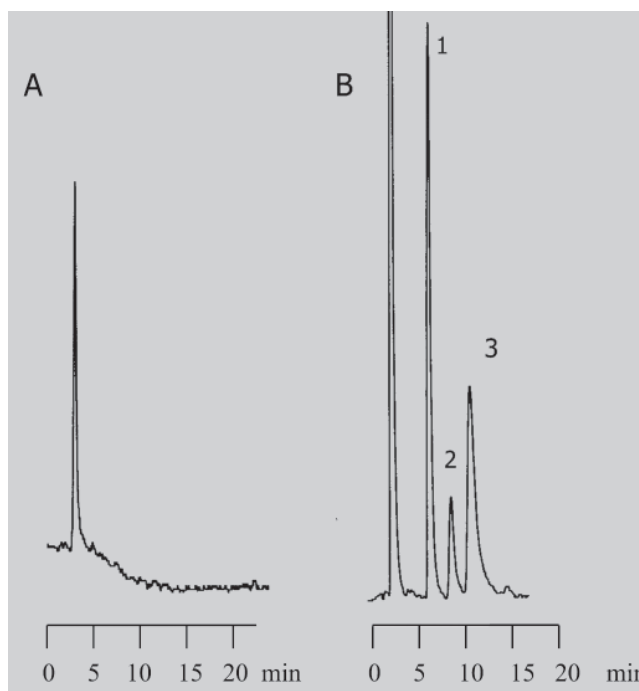
Para verificar a eficácia e aplicabilidade do método desenvolvido, foi realizada a análise de uma amostra obtida de um paciente adulto (40 anos, 62 kg, sexo feminino) sob tratamento com MTZ (30 mg/dia). Dez horas após administração da dose diária de MTZ foi efetuada a coleta de 5 mL de sangue, em tubo heparinizado. Após centrifugação a 1800 x g, durante 5 minutos, o plasma foi separado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise (estudo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 19-CEP/FCFRP).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização das condições

Exceto pelo método descrito por Morgan; Tapper; Spencer (2003), a separação da MTZ e DMTZ tem sido feita normalmente empregando colunas de fase reversa. Assim, empregamos uma coluna RP-8 que permitiu a separação do fármaco, metabólito e padrão interno em menos de 13 minutos. Os picos ligeiramente alargados, principalmente da MTZ, acontecem devido às interações secundárias entre os compostos básicos analisados e os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária. Esse maior alargamento dos picos não resultou em prejuízos significativos na sensibilidade e seletividade do método. A coluna de guarda CN empregada, por ser de tamanho reduzido (4 x 4 mm), não afeta significativamente a separação. A MTZ apresenta caráter básico, com  $pK_a$  de 7,1 (Kelder *et al.*, 1997) e, portanto, a extração foi feita em meio básico. A adição de 500 mg de NaCl teve influência apenas na extração do

metabólito, uma substância de caráter mais polar que a MTZ. O método de extração mostrou-se simples e capaz de extrair a MTZ e DMTZ eficientemente e eliminar interferentes do plasma. A Figura 2A mostra o cromatograma referente a um plasma branco.



**FIGURA 2-** Cromatogramas referentes a análise de MTZ e DMTZ em plasma. (A) Branco de plasma; (B) Amostra coletada 10 horas após administração de MTZ. Metoprolol (1); DMTZ (2); MTZ (3).

### Validação do método

O principal objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado aos seus propósitos. Para tanto, são adotados critérios que seguem normas de órgãos nacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e internacionais como o Food and Drug Administration (FDA, 2000).

A linearidade de um método é a sua habilidade de produzir resultados que são diretamente, ou por transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um certo intervalo (Causon, 1997). Para verificar a linearidade de um método é construída uma curva analítica com amostras extraídas da matriz apropriada em, no mínimo, 6 concentrações diferentes. Para avaliar os resultados, é utilizado o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo necessário obter alto coeficiente de correlação ( $r > 0,99$ ) e desvio do valor nominal menor ou igual a 15% (ANVISA, 2003). Neste trabalho foi empregada a faixa

de 2,5 a 500 ng/mL de plasma com 7 concentrações diferentes. Curvas analíticas típicas que demonstram a linearidade do método são descritas na Tabela I.

A recuperação reflete a quantidade do analito recuperada durante um processo de extração em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação foi avaliada calculando-se a concentração de amostras submetidas ao processo de extração, com base em uma curva analítica preparada a partir da injeção direta de soluções-padrão dos fármacos na fase móvel. A Tabela I mostra os resultados de recuperação para as quatro concentrações analisadas.

**TABELA I -** Recuperação e linearidade do método de análise da MTZ e DMTZ

Parâmetro	MTZ	DMTZ
<b>Linearidade</b>		
Intervalo (ng/mL)	2,5-500	2,5-500
Coefficiente angular	0,0068	0,0052
Coefficiente linear	-0,030	-0,016
Coefficiente de correlação	0,997	0,994
<b>Recuperação (%)</b>		
5 ng/mL	77,4	68,7
20 ng/mL	73,2	62,8
50 ng/mL	74,1	64,2
250 ng/mL	84,5	69,4
Media	77,3	66,3
CV (%)	5,8	4,2

CV, Coeficiente de variação

A precisão e exatidão determinam o erro de uma análise e são os critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. A precisão reflete a variação dos resultados quando repetidas análises são feitas em uma mesma amostra. O valor numérico usado é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo e deve ser menor que 15% (Bressole, Bromet-petit, Audran, 1996). Quando a análise das amostras controle é realizada no mesmo ensaio (ou no mesmo dia), os dados obtidos são expressos como precisão intra-ensaio. Análises feitas em dias diferentes são expressas como precisão interensaios. Exatidão é a concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico. É expressa em porcentagem do erro relativo, que deve ser inferior a 15% (Causon, 1997).

A Tabela II mostra os resultados obtidos nos estudos de precisão e exatidão, comprovando que o método atinge os critérios acima.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito de interesse quantificada com precisão e exatidão

**TABELA II** - Precisão e exatidão do método de análise de MTZ e DMTZ

	MTZ			DMTZ		
Concentração real (ng/mL)	400	100	7,5	400	100	7,5
Interensaios (n = 4)						
Concentração média	383,0	90,9	6,5	418,2	93,9	6,4
C V (%)	5,5	8,2	1,0	4,6	2,9	7,4
Exatidão (%)	-4,3	-9,1	-12,8	4,6	-6,0	-14,8
Intra-ensaio (n = 5)						
Concentração média	415,4	89,3	6,6	423,3	92,6	6,5
C V (%)	6,5	7,0	9,3	7,8	7,6	7,7
Exatidão (%)	3,9	-10,7	-11,7	5,8	-7,4	-13,8

CV, coeficiente de variação; n, número de determinações.

aceitáveis nas condições experimentais determinadas, ou seja, com coeficientes de variação e erros relativos inferiores a 20% (Causon, 1997). Através da análise de amostras de plasma fortificadas com concentrações decrescentes de MTZ e DMTZ (2,5 e 1,0 ng/mL), foi determinado como limite de quantificação a concentração de 2,5 ng/mL para ambos os analitos. Nesta concentração foram encontrados valores de precisão e exatidão de 11,4% e 15,0%, respectivamente, para a MTZ e 9,0% e 18,4% para a DMTZ. Esse limite de quantificação, embora superior aos valores relatados por alguns autores na literatura (Ptáek, Klíma, Macek, 2003; Maris, Dingler, Niehues, 1999; Morgan, Tapper, Spencer, 2003), é adequado para utiliza-

ção do método em estudos de disposição cinética (Dahl *et al.*, 1997).

A seletividade é a habilidade de um método de separar o analito de metabólitos, compostos endógenos e fármacos co-administrados (Bressole; Bromet-Petit; Audran, 1996). Para avaliar a seletividade do método foram feitas injeções de 25 µL de soluções-padrão na concentração de 1 mg/mL de diversos fármacos utilizados no tratamento de hipertensão, como anticonvulsivantes e medicamentos de venda livre, entre outros. A Tabela III mostra os medicamentos analisados no estudo de interferência.

Dentre os 26 fármacos analisados apenas 7 foram detectados e, destes, apenas a mexiletina apresentou tempo de retenção semelhante ao da DMTZ, embora o pico obtido tenha sido bastante pequeno, não sendo detectada em sua concentração terapêutica máxima. Bromazepam e pindolol que eluem próximos à DMTZ e PI, respectivamente, também não interferem no método.

**TABELA III** - Fármacos avaliados quanto à interferência no método

Fármaco	t <sub>R</sub> (min)	Fármaco	t <sub>R</sub> (min)
Atenolol	nd	Fenitoína	nd
Amitriptilina	nd	Flunitrazepam	17
Bromazepam	7,7	Fluoxetina	nd
Cafeína	nd	Imipramina	nd
Carbamazepina	nd	Levopromazina	nd
Cimetidina	17	Mexiletina	9,2
Clobazam	nd	Omeprazol	4
Clormezanona	nd	Pindolol	4,4
Clorpromazina	nd	Primidona	nd
Disopiramida	nd	Propranolol	nd
Diazepam	nd	Salbutamol	1,8
Diltiazem	nd	Tioridazina	nd
Dipirona	nd	Verapamil	nd

t<sub>R</sub>, tempo de retenção; nd, não detectado em 30 minutos de análise; tempos de retenção da MTZ = 11,7 min, DMTZ = 9,6 min e metoprolol = 5,8 min.

### Aplicação do método

Para verificar a eficácia e aplicabilidade do método desenvolvido, foi analisada uma amostra de plasma obtida de um voluntário aproximadamente 10 horas após a administração de 30 mg de MTZ, preparada de acordo com o procedimento já descrito. A Figura 2B mostra o resultado dessa análise. As concentrações obtidas para a MTZ e DMTZ foram 38,0 ng/mL e 14,2 ng/mL, respectivamente.

### CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de um método para análise da MTZ e seu metabólito ativo, a DMTZ. O



método, empregando uma coluna RP-8 e extração líquido-líquido, mostrou-se simples, rápido, preciso e com limite de quantificação e faixa de linearidade adequados para a análise da MTZ e seu metabólito em plasma.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

## ABSTRACT

### Simultaneous analysis of mirtazapine and N-demethylmirtazapine in plasma by high-performance liquid chromatography

*Simple, sensitive and selective analytical methods are required for pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring of mirtazapine, a new antidepressant drug. Thus high-performance liquid chromatography with fluorescence detection was used for the simultaneous analysis of mirtazapine and its metabolite, N-demethylmirtazapine, in plasma. After liquid-liquid extraction with toluene, the drug, metabolite and internal standard (metoprolol) were resolved using a LiChrospher 100 RP-8 endcapped column with a mobile phase of 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 3.5-acetonitrile (82:18, v/v). The method was linear in the range of 2.5 to 500 ng/mL for both analytes, with mean recoveries of 77% and 66% for mirtazapine and N-demethylmirtazapine, respectively. The quantification limits (2.5 ng/mL), precision (CV < 15%) and accuracy (relative errors < 15%) indicate the method is suitable for pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring.*

**UNITERMS:** Mirtazapine. N-demethylmirtazapine. HPLC. Plasma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2004.
- BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B*, v. 686, p. 3-10, 1996.
- CACCIA, S. Metabolism of the newer antidepressants – An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications. *Clin. Pharmacokinet.* v. 34, p. 281-302, 1998.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, v. 689, p. 175-180, 1997.
- DAHL, M.-L.; VOORTMAN, G.; ALM, C.; ELWIN C.-E., DELBRESSINE, L.; VOS, R.; BOGAARDS, J.J.P.; BERTILSSON, L. In vitro and in vivo studies on the disposition of mirtazapine in humans. *Clin. Drug Invest.*, v. 13, p. 37-46, 1997.
- FAWCETT, J; BARKIN, R. L. Review of the results from clinical studies on the efficacy, safety and tolerability of mirtazapine for the treatment of patients with major depression. *J. Affect. Disord.*, v. 51, p. 267-285, 1998.
- FDA. Guidance for industry – Analytical procedures and methods validation. Disponível em: <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>. Acesso em: 20 jul. 2004.
- FRAHNERT, C.; RAO, M. L.; GRASMÄDER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for drug monitoring. *J. Chromatogr. B*, v. 794, p. 35-47, 2003.
- KELDER, J; FUNKE, C.; DE BOER, T.; DELBRESSINE, L.; LEYSEN, D.; NICKOLSON, V. A comparison of the physicochemical and biological properties of mirtazapine and mianserin. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 49, p. 403-411, 1997.
- MARIS, F. A., DINGLER, E., NIEHUES, S. High-performance liquid chromatography assay with fluorescence detection for the routine monitoring of the antidepressant mirtazapine and its demethyl metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. B*, v. 721, p. 309-316, 1999.
- MORGAN, P. E.; TAPPER, J., SPENCER, E. P. Measurement of total mirtazapine and normirtazapine in plasma/serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, v. 798, p. 211-215, 2003.
- NUTT, D. Mirtazapine: pharmacology in relation to adverse effects. *Acta Psychiatr. Scand.*, v. 96, supp. 391, p. 31-37, 1997.

- PTÁEK, P.; KLÍMA, J.; MACEK, J. Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 794, p. 323-328, 2003.
- ROMIGUIERES, T.; PEHOURCQ, F.; MATOGA, M.; BEGAUD, B.; JARRY, C. Determination of mirtazapine and its demethyl metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Application to management of acute intoxication. *J. Chromatogr. B*, v. 775, p. 163-168, 2002.
- SANDKER, G. W.; VOS, R. M. E.; DELBRESSINE, L. P. C.; SLOOFF, M. J. H.; MEIJER, D. K. F.; GROOTHUIS, G. M. M. Metabolism of three pharmacologically active drugs in isolated human and rat hepatocytes: analysis of interspecies variability and comparison with metabolism in vivo. *Xenobiotica*, v. 24, p. 143-155, 1994.
- SHAMS, M. Therapeutic drug monitoring of the antidepressant mirtazapine and its N-demethylated metabolite in human serum. *Ther. Drug Monit.*, v. 26, p. 78-84, 2004.
- SUSSMAN, N.; STAHL, S. Update in the pharmacotherapy of depression. *Am. J. Med.*, v. 101, suppl 6a, p. 26S-36S, 1996.
- TIMMER, C. J.; AD SITSEN, J.M.; DELBRESSINE, L. P. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 38, p. 461-474, 2000.

Recebido para publicação em 29 de julho de 2004.

Aceito para publicação em 07 de outubro de 2005.

